

Beurteilung der Hyperkoagulabilität durch
Nachweis löslicher Fibrinmonomerkomplexe
(LFMK) bei normaler Schwangerschaft,
nicht infiziertem Abort, infiziertem
Abort und septischem Abort.

Edzard Ernst

1977

Beurteilung der Hyperkoagulabilität durch
Nachweis löslicher Fibrinmonomerkomplexe
(LFMK) bei normaler Schwangerschaft,
nicht infiziertem Abort, infiziertem
Abort und septischem Abort.

Edzard Ernst

Aus der I. Frauenklinik und Hebammenschule
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Zander

Beurteilung der Hyperkoagulabilität durch Nachweis
löslicher Fibrinmonomerkomplexe (LFMK) bei normaler
Schwangerschaft, nicht infiziertem Abort, infiziertem
Abort und septischem Abort.



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig - Maximilians - Universität zu München.

vorgelegt von

Edzard Ernst

Bad Tölz

1977



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter	:	Prof. Dr. H. Graeff
Mitberichterstatter	:	<i>Prof. Dr. Zander</i>
Dekan	:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung	:	26. JULI 1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555626_0023

MEINEN LIEBEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis.

- A Einleitung
 - 1. Hyperkoagulabilität in der Schwangerschaft
 - 2. Definition der Hyperkoagulabilität
 - 3. Septischer Abort und seine möglichen Folgen
 - 4. Die Heparin-Prophylaxe

- B Themenstellung

- C Untersuchungsgut
 - 1. Normale Schwangerschaft bis 20. Woche
 - 2. Nicht infizierte Aborte
 - 3. Infizierte Aborte
 - 4. Septischer Abort
 - 5. Septische Aborte mit Heparin behandelt
 - 6. Verlaufskontrollen

- D Methoden und Material
 - I. Experimentell
 - 1. Blutentnahme
 - 2. Hämatokrit
 - 3. Thrombozytenzählung
 - 4. Äthanoltest
 - 5. Fibrinogenbestimmung
 - 6. Beta-Alanin-Fällung
 - 7. Agarose-Gelfiltration
 - 8. Berechnung des LFMK-Gehaltes
 - 9. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

 - II. Statistik

E Ergebnisse

I. Statistik

1. Prüfung auf Normalverteilung
2. Signifikanz-Tests

II. Der Bestimmungen

1. Übersicht
2. LFMK-Wert
3. Fibrinogengehalt
4. Thrombozytenzahl
5. Verlaufskontrolle
6. Äthanoltest
7. Gel-Elektrophorese
8. Aufspalten in Polypeptidketten

F Diskussion

1. LFMK-Anstieg als Ausdruck und Indikator der Hyperkoagulabilität bei septischen Aborten
2. Ursachen und Folgen der LFMK-Erhöhung
3. Gesteigerter Fibrinogenstoffwechsel
4. Thrombozytopenie
5. Serienbestimmung
6. Parallelen zwischen LFMK und Cryofibrin
7. Differentialdiagnose zwischen Hyperkoagulabilität und DIC
8. Experimentelle Bestätigung der Heparin-Prophylaxe
9. Die Gelfiltration: Vorzüge und Fehlerquellen

G Zusammenfassung

Anhang: Literaturverzeichnis

A. EINLEITUNG.

Das gegenüber Männern bereits erhöhte Risiko der Frauen, an einer erworbenen Störung der Hämostase zu erkranken, erhöht sich nochmals in der Schwangerschaft, in der ja gerinnungsphysiologische Verhältnisse bestehen, die bei Nichtgraviden schon als pathologisch gelten würden (1). Dementsprechend sind disseminierte intravasculäre Gerinnung (DIC) und Thrombose während der Schwangerschaft häufiger als bei nichtgraviden Patientinnen. In den letzten Jahren erkannte man den disseminierten Ausfall von Fibrin mit Verbrauch plasmatischer Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten als eigentliche Komplikation des Endotoxinschocks in der Schwangerschaft (2,3,4,5).

Die Arbeitsgruppen um Fletcher, Vermynen und Graeff konnten im menschlichen Blut ein Fibrinderivat nachweisen, dessen Molekulargewicht höher ist als das des Fibrin selbst (6,7,8). Dieses Derivat kann in vivo nur durch Thrombineinwirkung auf Fibrinogen entstanden sein; es wird daher im Folgenden als löslicher Fibrinmonomerkomplex, LFMK, bezeichnet (9).

Liegen LFMK beim Gesunden in verschwindend geringem Maß vor, so läßt sich während der Schwangerschaft ein mäßiger, aber deutlicher Anstieg bis zum Mittelwert 4,9 % vor der Geburt beobachten (10). Zwischen dem Auftreten des LFMK und der sogenannten Hyperkoagulabilität besteht ein ursächlicher Zusammenhang (6,7,9).

Unter Hyperkoagulabilität ist eine Erhöhung der gerinnungsfördernden Faktoren im Plasma, bzw. vermehrte Gerinnungsaktivität des Plasmas bei gleichzeitig herabgesetzter fibrinolytischer Aktivität zu verstehen. Diesen Zustand bezeichnet Marx als Hyperkoagulabilität 1. Grades, von der er die Hyperkoagulabilität 2. Grades abgrenzt. Diese ist definiert als ein Zustand, bei

dem Zwischen- und Endprodukte der Gerinnung im strömenden Blut auftreten (11).

Kommt es nun im Verlauf einer Schwangerschaft zu einem Endotoxinschock infolge septischen Aborts, so scheint die Hyperkoagulabilität mit verantwortlich für die Schwere des Krankheitsbildes zu sein. Diese Schockform ist klinisch gekennzeichnet durch unzureichende Blutdurchströmung (12,13,14), deren Folge akut einsetzende haemodynamische Insuffizienz, verminderte Durchblutung der terminalen Strombahn, herabgesetzte Sauerstoffversorgung der betroffenen Gefäßabschnitte und resultierende metabolische Azidose sein können (15).

Der Zusammenhang zwischen Schocksymptome und Mortalität einerseits, und Höhe des Fiebers und dem Auftreten von Schüttelfrösten andererseits, ist eindeutig (16).

Das oben Gesagte macht deutlich, wie bedrohlich das Krankheitsbild eines septischen Abortes ist. Daraus ergibt sich die Forderung nach einer wirksam prophylaktischen Therapie.

Seit 1965 wurden deshalb in der 1. Frauenklinik der Universität München die Heparintherapie beim septischen Abort eingeführt. In der Vorstellung, die Verabreichung von Heparin verhüte die intravasale Gerinnung, wurde allen Graviden mit Temperaturen von über 39° C und/oder Schüttelfrost 30.000 IE Heparin pro Tag i.v. injiziert. Bei 371 derart behandelten Frauen mußte kein mütterlicher Todesfall verzeichnet werden. In 15,9 % dieser Fälle entwickelte sich ein schockähnliches Syndrom, das jedoch stets reversibel und ohne Organfunktionsstörungen blieb. Akutes Nierenversagen, pulmonale Insuffizienz oder Azidose als Zeichen des fortgeschrittenen Schocks wurden in keinem Fall beobachtet. (17).

B. THEMENSTELLUNG.

Um solche guten Ergebnisse zu erzielen, oder sie noch zu verbessern, ist es allerdings nötig hyperkoagulable Zustände während der Schwangerschaft möglichst früh zu erkennen. Erstmals gelang es Fletcher 1970 in Fällen von sogenannter Hyperkoagulabilität Fibrinogen-Umsatzprodukte im Plasma nachzuweisen (6). In mehreren Arbeiten berichteten Graeff und v. Hugo von ähnlichen Ergebnissen unter Verwendung einer modifizierten Technik (7,9,8). Es wurde der ursächliche Zusammenhang zwischen Hyperkoagulabilität und erhöhter Disposition zur disseminierten intravasalen Gerinnung und dem Auftreten von LFMK deutlich. Der Nachweis von LFMK gelingt mit Hilfe der Agarose-Gel-Filtration unter Verwendung von Säulen, die mit Biogel A 15 m gefüllt sind (6,7,8,19).

Da nun einerseits die prophylaktische Heparintherapie so erfolgreich erscheint, andererseits sie aber nur auf klinische Beobachtung gestützt ist, ist es von Interesse, ob die unterstellte Hyperkoagulabilität bei Patientinnen mit septischem Abort durch quantitative Untersuchungen gestützt werden kann. Dazu soll die folgende Arbeit einen Beitrag leisten.

C. UNTERSUCHUNGSGUT.

Im Laufe des experimentellen Teils der Arbeit wurden insgesamt 68 Patientinnen Blutproben entnommen und untersucht. Dieses Kollektiv setzt sich auf folgenden Untergruppen zusammen:

Gruppe a:

Sie besteht aus 21 gesunden Primi- und Multiparae im Lebensalter von 20 - 35 Jahren. Die Patientinnen befanden sich in der 6. bis 20. Schwangerschaftswoche.

Gruppe b:

Diese Gruppe setzt sich aus 13 Patientinnen zusammen, die wegen eines nicht infizierten Abortes stationär in der 1. Frauenklinik der Universität München aufgenommen worden waren. Unter nicht infiziertem Abort wurde ein Abortus verstanden, bei dem kein Fieberanstieg zu beobachten war.

Gruppe c:

Sie wird gebildet von 10 Patientinnen, die wegen eines infizierten Abortes in der Klinik lagen. Dabei wurde unter infiziertem Abort definitionsgemäß ein Abortus verstanden, bei dem es zu Temperaturen zwischen 38° und $38,9^{\circ}$ C kam, und extragenitale Ursachen, die für das Fieber verantwortlich gewesen sein könnten, ausgeschlossen worden waren. Die bakterielle Entzündung beschränkte sich in diesen Fällen ausschließlich auf Uterus und Uterusinhalt (15,20,21).

Gruppe d:

Diese Gruppe bildet den Kern dieser Arbeit. Sie besteht aus 14 Patientinnen mit septischem Abort, bei denen noch keinerlei Therapie begonnen worden war. Ein septischer Abort wurde dann angenommen, wenn es im Laufe eines Abortus zu einer Temperatur von über 39° C und/oder Schüttelfrost kam und extragenitale Fieberursachen nicht vorlagen (17,20,21). Eine Sepsis im klassischen Sinne, mit Erregereinschwemmung im Blut, liegt

dabei nur selten vor, da das schwere Krankheitsbild meist vorwiegend durch Überschwemmung des Organismus mit bakteriellen Toxinin bedingt ist. Der Begriff septischer Abort ist also in diesem Zusammenhang als vorwiegend klinisch orientiert zu verstehen.

Die Ursache des infizierten und septischen Abortes ist meist ein inadäquat induziertes Abortgeschehen. Dabei kommt es oft 24 oder mehr Stunden nach dem Eingriff zur bakteriellen Infektion von Uterusinhalt, Myo- und Endometrium mit entsprechendem Fieberanstieg. Ohne Behandlung entwickelt sich dann in besonders schweren Fällen Schocksymptomatik (17).

Gruppe e:

Dabei handelt es sich um 7 Patientinnen, die mit septischem Abort in die Klinik eingeliefert wurden, bei denen der Zeitpunkt der Blutentnahme jedoch einige Zeit nach Beginn der Heparinprophylaxe lag. Diese Gruppe ergab sich erst im Laufe des experimentellen Teils der Arbeit; und zwar deswegen, weil es oft trotz der vorzüglichen Zusammenarbeit mit der septischen Station der 1. Frauenklinik nicht immer gelang, Blut zu entnehmen, ehe eine Therapie eingeleitet worden war. So entstand eine Gruppe von Heparin-anbehandelten Patientinnen, und es tauchte die Frage auf, wie sich wohl die Parameter der Hyperkoagulabilität unter einer solchen Behandlung ändern würden.

In diesem Zusammenhang interessierte auch eine Verlaufskontrolle dieser Parameter bei septischen Aborten im weiteren Verlauf der Heparin-Therapie. Es gelang bei drei derartigen Fällen solche Serienbestimmungen durchzuführen. Sie wurden als zusätzliche Ergänzung in diese Arbeit mit aufgenommen.

D. METHODEN.

I. Experimentell.

1. Blutentnahme.

In allen Fällen wurde das Blut mittels Punktion der Vena cubitalis entnommen. Um den verfälschenden Einfluß des Gewebethromboplastins auf die Untersuchungen zu vermeiden, wurde jeweils nur einmal gestochen und im Zweispritzverfahren vorgegangen: Lag die Einmalkanüle (0,8 x 32 mm) in der Vene, wurde in die erste Spritze etwas Blut aufgezogen. Sodann wurde dieses verworfen und eine zweite 10 ml Einmalspritze, in die zuvor 1 ml eines Zitrat-Trasylool-Gemisches aufgezogen worden war, angeschlossen. Diese Spritze wurde nun bis zur 10 ml-Marke mit Blut gefüllt. Dadurch wurde ein Mischungsverhältnis Blut zu Antikoagulanzen wie 9:1 erreicht. Die Endkonzentration von Trasylool im Blut betrug 100 KIE/ml. Das Gemisch wurde nach der Entnahme in Monovetten gefüllt, mit Parafilm verschlossen und vorsichtig geschüttelt. Eine gute Durchmischung des Blutes mit dem Antikoagulanzen wurde durch dieses Vorgehen gewährleistet.

Alle Blutproben wurden unter identischen Bedingungen entnommen und zwar innerhalb eines Zeitraums von ca. 6 Monaten.

Unmittelbar nach der Entnahme wurde das Blut in das Labor transportiert und den nachfolgenden Bestimmungen unterzogen. Diese wurden in der Regel von Frischblut gemacht, so daß eine Blutaufbewahrung in den allermeisten Fällen nicht nötig wurde. War das aus irgendwelchen Gründen nicht möglich, so wurde plättchenarmes Plasma hergestellt, und dieses bei minus 24° C höchstens 4 Wochen lang gelagert.

Das folgende Schema gibt eine Übersicht über die durchgeführten Untersuchungen. Nähere Erläuterung bietet der Text.

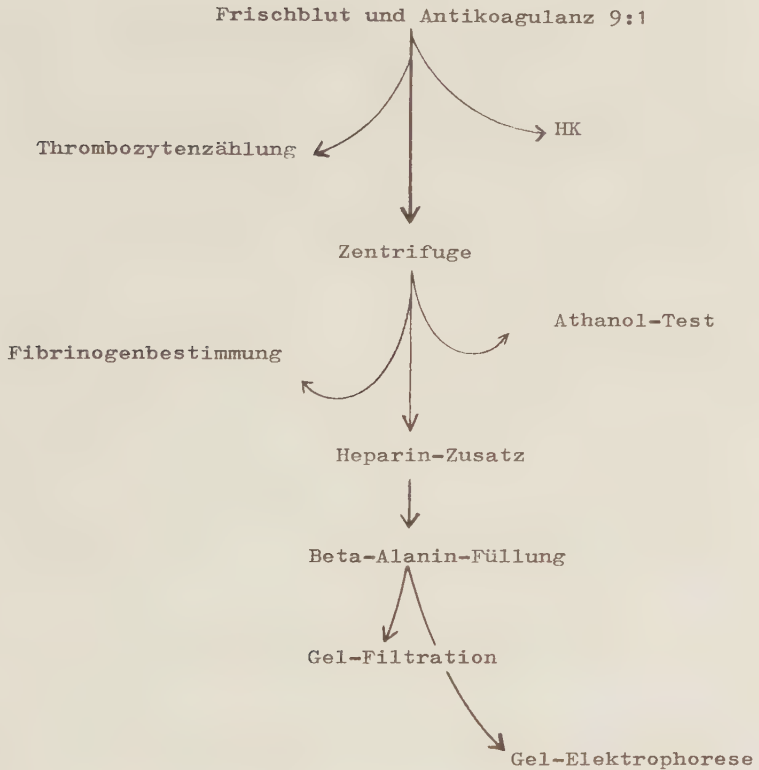


Abb. 1

Übersicht und Reihenfolge der durchgeführten Untersuchungen. Näheres siehe Text.

Material zur Blutentnahme:

Monovetten (Sarstedt) 10 ml Einmalkanülen

Citrat Trasolyl Gemisch pH = 7,5:

Na-Citrat-2-hydrat 3,80 g

TES 1,38 g

Trasylol 10,0 ml

ad 100 ml aquadest

TES: N-Tris (hydroxy-methyl) - methyl-2

amino-äther-sulfonsäure

M.G.: 229,2 (Serva Heidelberg/37199)

Trasylol: 1 Ampulle = 10 ml = 100000 KIE

(Kallikrein-Inaktivator-Einheiten)

(Bayer-Leverkusen / T 653)

2. Hämotokritbestimmung.

Da diese Methode nach Strumia (22) zur Laborroutine gehört, bedarf sie keiner näheren Erläuterung. Zu beachten war lediglich, daß das mit Antikoagulanzen gemischte Venenblut unmittelbar vor der Untersuchung geschüttelt wurde, da sich bereits nach kurzem Stehen der Proben falsche Werte ergaben. Außerdem mußte der Fehler, der sich durch die Verdünnung mit Antikoagulanzen ergab, rechnerisch berücksichtigt werden. Dies geschieht nach folgender Formel:

$$\text{HK (korrigiert)} = \text{HK (unkorrigiert)} - 10 \% \text{ HK (unkorrigiert)}$$

Zur Bestimmung wurden Mikro-Hämatokrit-Tubes der Fa. Adams (Parsipenny, New York, USA) verwendet.

3. Thrombozytenzählung.

Die Zahl der Thrombozyten wurde durch direkte Zählung in einem Phasenkontrastmikroskop (Leitz-KG, Wetzlar) bestimmt. Es wurde nach der Methode von Feissli und Ludin (1949) vorgegangen: In einer Erypipette wird Citratblut

bis zur Marke 0,5 und Novocainlösung bis zur Marke 1,01 aufgezogen, gemischt und 20 Minuten liegen gelassen. Dadurch kommt es zur vollständigen Hämolyse der Erythrozyten. Hierauf wird eine Neubauer-Zählkammer mit dem Gemisch gefüllt (die ersten Tropfen werden verworfen) und die Zählkammer für weitere 20 Minuten in einer feuchten Kammer ruhen gelassen. Dadurch wird erreicht, daß die Plättchen alle in eine Ebene absinken und im Fokus des Mikroskops einwandfrei zu erkennen sind. Vorzeitige Auszählung hätte zur Folge, daß die in der Flüssigkeit schwebenden Thrombozyten nicht erkennbar wären, und sich fälschlicherweise zu niedrige Werte ergäben. Unter dem Phasenkontrastmikroskop werden zwei Quadrate der Kammer ausgezählt. Die so gefundene Zahl der Thrombozyten wird mit dem Faktor 1111 multipliziert; dabei ist der Verdünnung des Venenblutes durch Antikoagulanz mit Rechnung getragen. Es ist darauf zu achten, daß Erypipette und Zählkammer vor der Untersuchung besonders sorgfältig gereinigt werden.

Material für die Thrombozytenzählung.

Novocain-Kochsalzlösung:

Novocain 2 g

NaCl 0,2 g

aquadest. ad 100 ml.

Neubauer-Zählkammer

Feuchte Kammer (Petrischale mit Deckel; Boden mit feuchtem Zellstoff bedeckt)

Phasenkontrastmikroskop Leitz KG Wetzlar

Erythrozytenpipette

Sind diese beiden Bestimmungen abgeschlossen, so wird das Blut von seinen korpuskulären Bestandteilen befreit und plättchenarmes Plasma hergestellt, mit dem alle weiteren Untersuchungen durchgeführt werden. Dies geschieht dadurch, daß die Blutproben in einer gekühlten Zentrifuge (+ 4° C bei 1200 g) 20 Minuten lang zentrifugiert werden. Nachdem

die Zentrifuge ohne Abbremsen ausgelaufen ist, wird das Plasma vorsichtig abpipettiert, ohne daß Erythrozyten angesaugt werden.

4. Äthanoltest.

Der Äthanoltest beruht auf dem Phänomen der Parakoagulation. In der Kälte oder durch Zusatz von Protaminsulfat, Plättchenfaktor 4, oder Äthanol kommt es zur Ausflockung eines Geles. Der Test wird nach Godal und Abildgaard (23,24) in einer Modifikation von Kuhn und Graeff durchgeführt, in dem zu 1 ml plättchenarmen Plasma 0,3 ml Äthanol-TES-Puffer hinzugefügt werden. Das Gemisch wird einmal sanft geschüttelt und exakt 10 Minuten stehen gelassen. Dann wird das Ergebnis abgelesen und notiert. Durch die Äthanol-Zugabe werden die im Plasma befindlichen löslichen Fibrinmonomerkomplexe (LFMK) in ihrem Lösungsverhalten so beeinflusst, daß sie unter Ausbildung eines feinen Spinnwebgerinsels (Test (+)), eines Fadens (Test +), oder eines gallertartigen Gerinnsels (Test ++) ausfallen. Wichtig ist, daß dieser Test spätestens 2 Stunden nach der Blutentnahme beendet ist, da ab diesem Zeitpunkt die Ergebnisse nicht mehr zuverlässig sind (23).

Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

Eine mögliche Fehlerquelle bei diesem Test liegt darin, daß bei nicht glatt verlaufender Venenpunktion geringste Thrombinspuren mit aufgezogen wurden. Da das Fibrinmonomer das Produkt von Thrombin auf Fibrinogen ist, würden in diesem Falle falsch positive Werte entstehen. Durch die oben aufgeführte Methode der Blutabnahme wurde diese Fehlerquelle so niedrig wie möglich gehalten (42).

Material zum Äthanol-Test.

Äthanol-TES-Puffer, pH 7,8, Ionenstärke 0,06:

13,7 g TES

1/10 NaCl-Lösung zur Einstellung auf pH 7,8

aquadest. ad 500 ml + 500 ml Äthanol

Reagenzröhrchen, Stoppuhr.

5. Fibrinogenbestimmung.

Von allen plasmatischen Gerinnungsfaktoren ist das Fibrinogen der einzige, der infolge seiner hohen Plasmakonzentration sich auf den absoluten Wert in mg% bestimmen läßt. Dazu sind in der Literatur manigfache Methoden angegeben. In dieser Arbeit wurden nach der Methode von Blombäck und Blombäck vorgegangen. Sie gelangt in der Modifikation von Hörmann und Gollwitzer zur Anwendung (26,25).

Zu je 0,5 ml plättchenarmen Plasma werden 2,5 ml Phosphatpuffer und 0,1 ml Thrombinlösung (Test-Thrombin in 1 ml aquadest gelöst) hinzugefügt. Nach kräftigem Durchmischen werden die Proben 2 Stunden lang stehen gelassen. Nach diesem Zeitraum ist die Polymerisation abgeschlossen, was sich daraus erkennen läßt, daß sich im Reagenzglas ein gallertiges Gerinnsel befindet. Aus Fibrinogen entstand Thrombin-induziert Fibrin. Diese Reaktion, die den entscheidenden Schritt im Mechanismus der Blutgerinnung darstellt, läuft unter Mitwirkung zahlreicher Gerinnungsfaktoren in 4 Phasen ab (27,28). Ihr Endprodukt ist das in vivo unlösliche Fibrin. Das Gerinnsel wird mit einem Glashäkchen entnommen und auf ein Stück Nylogewebe gelegt. Darauf wird es vorsichtig mit einem Glasstab ausgedrückt und von seinen ungerinnbaren Substanzen befreit, so daß nur ein dünnes Fibrinhäutchen übrig bleibt. Dieses wird dreimal hintereinander in 0,15 M NaCl-Lösung gewaschen. In einer vorbereiteten 40%igen Harnstofflösung wird das Fibrinhäutchen wieder gelöst. Frühestens 1 Stunde danach wird die, durch das gelöste Fibrin entstandene Trübung, photometrisch gegen eine Blindlösung gemessen. Dazu werden Quarzküvetten (1 cm) und ein Hitachi-Spectralphotometer verwendet. Die Messung wird bei 280 und 325 nm durchgeführt. Es wird die Differenz ΔE aus beiden Extinktionen errechnet. Die Berechnung des Fibrinogengehalts gelingt nach folgender Formel:

mg Fibrinogen / ml Plasma = $\Delta E \times 6,927 \times 2$,
wobei sich der Faktor 6,927 aus dem Extinktionskoeffizienten für Fibrinogen in Alkali von 15,87 nach Hörmann und Gollwitzer (26) ergibt. Da einerseits Fibrinogen pro ml Plasma angegeben wird, andererseits aber das Blut um das Antikoagulanzen verdünnt wurde (s.o.) und die zellulären Bestandteile des Blutes abzentrifugiert wurden müssen diese Fehler noch berücksichtigt werden (29). Dies geschieht nach folgender Formel:

$$\text{Fibrinogen}_{(\text{korrigiert})} = \text{mg\% Fibrinogen}_{(\text{unkorrigiert})} \times$$

$$\frac{100 - \text{HK}}{(100 - \text{HK}) - 10}$$

In dieser Formel ist HK der nicht korrigierte Hämatokrit (s.o.).

Die Fibrinogenbestimmungen wurden stets als Doppelbestimmungen durchgeführt. Der endgültige Wert wurde als arithmetisches Mittel beider sich ergebender Werte festgelegt. In einer großen Serie wurde die Berechnung der Präzision dieser Methode durchgeführt. Es ergab sich ein Variationskoeffizient von 1,8 %.

Ein gewisser unvermeidlicher Fehler dieser Methode liegt darin, daß nicht Fibrinogen direkt, sondern erst nach Überführung in Fibrin bestimmt wird. Im Verlauf der Reaktion Fibrinogen $\longrightarrow$ Fibrin spaltet jedoch Thrombin vom Fibrinogenmolekül Fibrinopeptide ab, die etwa 2-3 % des Moleküls ausmachen. Zusätzlich ergibt sich eine geringe Ungenauigkeit dadurch, daß das entstehende Gerinnsel nicht gerinnbare Anteile mitreißen kann. Bei den Bedingungen dieser Methode (pH und Ionenverteilung) sind diese Störungsmöglichkeiten jedoch so gering, daß der durchschnittliche Fehler mit 3-4 % angegeben wird (63,25).

Material zur Fibrinogenbestimmung:

Phosphatpuffer: 0,01 m , 0,15 m an NaCl, pH = 6,35

Thrombinlösung: 4,5 NIH Test-Thrombin ORHT Behring-Werke, Marburg

NaCl-Lösung 0,15 m

40 % Harnstofflösung: 0,2 n an NaOH.

NaCl-Lösung: 0,3 n

Reagenzröhrchen, Glashäkchen, Nylongewebe, Quarzküvetten, Spektralphotometer, Hitachi 181.

6. Beta-Alanin-Fällung.

2,5 ml plättchenarmen Plasmas werden in einem Eiswasserbad bei 0° C gehalten. In einem Zeitraum von 10 Minuten tropft langsam unter ständigem Rühren mittels Magnetprüher 3 ml einer vorher vorbereiteten 40%igen Beta-Alanin-Lösung hinzu. Es wird darauf geachtet, daß das Zutropfen so langsam vor sich geht, daß die Temperatur des Gemisches nie über 0° C steigen kann und daß beim Rühren keine Schaumbildung hervorgerufen wird. Beides könnte zufolge haben, daß das Protein denaturiert (30). Die Endkonzentration von Beta-Alanin ist 2,5 n. Die Proteine der Fibrinogenfraktion werden derart beeinflusst, daß sie mit zunehmender Beta-Alanin-Konzentration selektiv ausfallen. Nach weiteren 10 Minuten hat sich ein Niederschlag in dem Gemisch gebildet. Dieser wird in einer gekühlten Zentrifuge (+ 4° C) mit 2.000 g 20 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und der Niederschlag unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur mit 1 ml TES-Trasylol-Citratpuffer (pH = 7,5) wieder gelöst. Falls eine Resttrübung verbleibt, wird sie durch Zentrifugieren in einer Tischzentrifuge (Hettich EBA III) entfernt.

Durch dieses Vorgehen wird erreicht, daß andere störende Proteine, die den Fibrinogenbereich überlagern, aus dem Plasma entfernt werden. Eine weitere Auftrennung und Beurteilung dieses Bereichs, wie im folgenden geschieht, wird so ermöglicht.

Material zur Beta-Alanin-Fällung:

Kristallines Beta-Alanin $C_3H_7NO_2$; MG: 89,1; Serva Heidelberg / 11490

TES-Trasylol-Citratpuffer

0,06 m TES (s.o.)

0,081 m NaCl

0,0129 m Tri-Na-Citrat

100 000 KIE Trasylol/1000 ml

Reagenzröhrchen, Magnetrührer, Kühlzentrifuge, Tischzentrifuge.

7. Agarose-Gel-Filtration.

Das Prinzip der Gel-Filtration beruht auf einem Molekularsiebeffekt. Hierbei werden die durchlaufenden Moleküle nach ihrer Größe getrennt. Agarose ist eine unlösliche Granula aus Polysaccharid mit definierter Porengröße (32). Moleküle, die klein genug sind, um in die Poren einzudringen, wandern langsamer als solche, die dafür zu groß sind. Der Logarithmus des Verhältnisses von Leervolumen (Flüssigkeitsmenge zwischen der Granula) und dem Elutionsvolumen (Durchlaufmenge bis zum Erscheinen der ersten Substanz) ist bei globulär gebauten Proteinen umgekehrt proportional dem Molekulargewicht der entsprechenden Substanz (31). Das ist bei Fibrinogen nicht der Fall. Das liegt daran, daß das Molekül eine langgestreckte Form besetzt ($450 \text{ \AA}$ x $50-60 \text{ \AA}$) und sich deshalb wie ein globuläres Protein mit weit höherem Molekulargewicht verhält.

Die Gel-Filtration erfolgt an 4%iger Agarose (Biogel A-15 m 100 - 200 mesch Bio. Rad. Lab. München). Auf $1,5 \times 80$ cm Säulen, die mit diesem Gel gefüllt sind, werden ca. 1 ml der Proben aufgetragen, die durch die oben beschriebene Beta-Alanin-Fällung gewonnen wurden. Der Proteinanteil ist gemäß vorheriger photometrischer Bestimmung 5-8mg.

Sie werden mit Tris-Cl-Citrat-Puffer (pH = 7,6) bei einer Durchflussrate von 13 ml pro Stunde eluiert. Das Eluat wird in Portionen von 3 ml mit einem Fraktionssammler aufgefangen. Noch am gleichen Tag wird die optische Dichte der Fraktion bei 280 und 325 nm in einem Hitachi-Spektralphotometer gemessen. Die Differenz der beiden Extinktionen ($\Delta E = E_{280} - E_{325}$) wird gebildet. Wird ΔE gegen das Elutionsvolumen auf Millimeterpapier aufgetragen, so ergibt sich ein typischer Kurvenverlauf. Abbildung 2 zeigt dafür ein Beispiel.

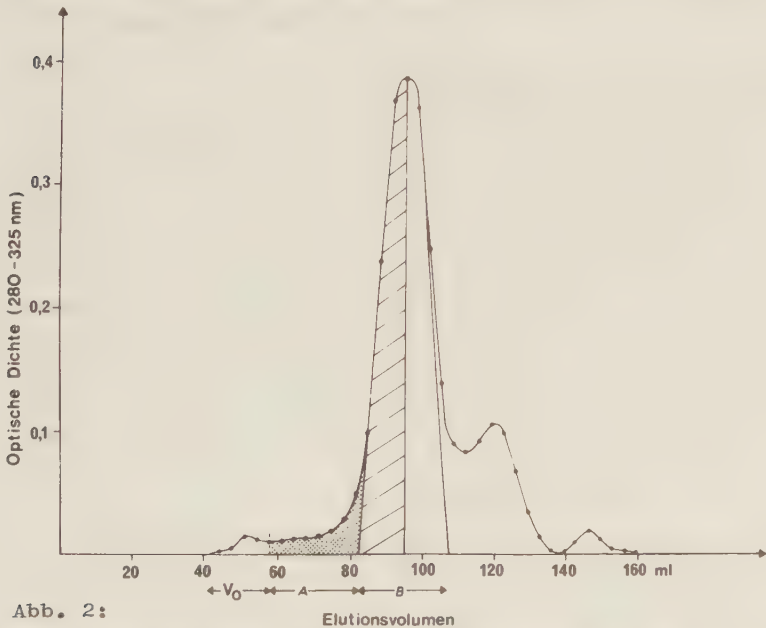


Abb. 2:

Elutionskurve nach Agarose-Gel-Filtration (Biogel A-15 m) β -Alanin-gefällter Plasmaproben. Optische Dichte (280-325nm) Der Kurvenausschnitt zwischen dem Ausschlußvolumen und dem des aufsteigenden Teil des Fibrinogenpeaks (A) wird mit dem des Fibrinogenpeaks (B) verglichen. Der prozentuale Anteil an LFMK (in Relation zum Gesamtfibrinogengehalt) wird nach folgender Formel bestimmt: $\% \text{ LFMK} = A \times 100 / A + B$.

Material zur Agarose-Gel-Filtration:

Biogel A - 15 m, 100 - 200 mesh, Bio.Rad.Lab. München

Tris-Cl-Citrat-Puffer, pH = 7,6 :

0,05 N Tris

0,116 M NaCl

0,0129 M Tri-Na-Citrat

0,2 M E-Amino-Capron-Säure (EACA)

0,025 % Na-Azid mit HCl auf pH = 7,6 eingestellt.

Reagenzröhrchen, 1,5 x 80 cm Säulen, Pumpe, Fraktions-sammler, Quarzküvetten, Spektralphotometer, Hitachi 181.

8. Berechnung des LFMK-Gehalts.

In der Kurve (Abb.2) sieht man, daß zwischen dem eigentlichen Fibrinogenpeak und dem Ausschlußvolumen sich eine "Vorschulter" abzeichnet. Die Vorschulter wird durch den LFMK-Anteil im Plasma hervorgerufen (33). Um den Anteil von LFMK am Gesamtfibrinogen zu ermitteln, werden die Vorschulter (A) und der halbe Fibrinogenpeak (B) planimetriert. Hierzu werden die jeweiligen Flächen auf Pauspapier aufgezeichnet, ausgeschnitten und auf einer Analysenwaage gewogen. Aus den Gewichten der Flächen errechnet sich der prozentuale Anteil von LFMK an Gesamtfibrinogen wie folgt:

$$\text{LFMK\%} = \frac{A \text{ (mg)} \times 100}{A \text{ (mg)} + 2B \text{ (mg)}}$$

Der absolute Gehalt an LFMK errechnet sich daraus nach folgender Formel:

$$\text{LFMKmg/100 ml} = \frac{\text{LFMK\%} \times \text{Fibrinogen mg/100 ml}}{100}$$

In einer gesonderten Untersuchung wurde die Präzision dieser Bestimmungsmethode geprüft. Dabei ergab sich für Doppelbestimmungen eine Präzision in der Serie mit einem Variationskoeffizienten von 8,0, bei Mehrfachbestimmungen aus gepolten Proben eine Präzision von Tag zu Tag mit einem Variationskoeffizienten von 8,1.

Der Nachweis, daß sich bei der Vorschulter und dem Fibrinogenpeak tatsächlich um Fibrinogen bzw. seine Derivate handelt, wurde sowohl mit Staphylokokken-clumpingtest (Behring-Werke, Marburg), als auch mit der nachfolgenden Polyacrylamid-Elektrophorese geführt.

Material:

Millimeter-Papier, Pauspapier, Analysenwaage.

9. Polyacrylamid-Elektrophorese.

Mittels der Elektrophorese wird das Material entsprechend der Molekulargewichts- und Ladungsdifferenzen weiter aufgetrennt. Entsprechend der Methode von Weber und Osborn wird 7,5%iges Trenn-Gel. (6 x 60 mm) mit 0,1 m Phosphatpuffer (pH = 7,0) in Gegenwart von 0,1%igen Na-Dodecylsulfat als Elektrodenpuffer verwendet. 7,5%ige Trenngele werden für die Auftrennung der reduzierten Proben (Einzelketten des Fibrinogens) verwendet. 5%ige Trenngele dienen zur Untersuchung der im Harnstoff denaturierten Proben. Es kann damit beurteilt werden, ob evtl. nicht dissoziierbare LFMK vorliegen und ob Abbaustufen des Fibrinogens vorhanden sind. Ferner können Verunreinigungen durch Plasmaproteine festgestellt werden.

Die Fraktionen werden, falls nötig, konzentriert, in dem sie in Visking-Tubings gegen Polyäthylenglycol dialysiert werden. Sie werden reduziert durch zweistündiges Inkubieren bei 37° C, 1%igem 2-Mercaptoäthanol, 0,2%igem (W/V) SDS und 6 m Harnstoff nach vorheriger Dialyse gegen 0,1 m Phosphatpuffer (pH = 7,0).

Die Dauer der Elektrophorese betrug 8 oder 14 Stunden. Sie wurde bei einer Spannung von 80 V und einer Stromstärke von 5 mA vorgenommen. Die Gele wurden mit Coomassie Brillantblau gefärbt.

II. Statistische Methoden.

Zur Überprüfung der Normalverteilung der gefundenen Werte wurde sowohl die Probitgerade als auch das Range-Median-Verfahren herangezogen. Innerhalb der verschiedenen Gruppen (a,b,c,d,e) wurden die einzelnen Parameter zusammengestellt und deren Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Diese wurden mit dem t-Test und dem nicht parametrischen Wilcoxon miteinander verglichen (35).

E. ERGEBNISSE.

Die Prüfung auf Normalverteilung ergab bei beiden angewendeten Methoden in allen Fällen ein positives Ergebnis. Die Beurteilung des Probitverfahrens erfolgt rein optisch, in dem geprüft wird, ob die Einzelergebnisse, repräsentiert durch Punkte, entlang der Probitgeraden liegen. Bei dem Range-Median-Verfahren wird der Mittelwert mit dem Medianwert (der Wert, der beim Aufstellen einer Rangfolge der Einzelwerte die mittlere Stelle einnimmt) verglichen. Dabei ergab sich eine durchschnittliche Abweichung beider Werte von 4,89 %, was einem Variationskoeffizienten von 3,97 entspricht.

Zwar sind beide Verfahren relativ ungenaue Methoden, jedoch ist ihr durchwegs positiver Befund und konstante Übereinstimmung Grund genug davon auszugehen, daß es sich bei den Ergebnissen jeweils um Normalverteilungen handelt. Somit ist es erlaubt zur Überprüfung der statistischen Signifikanzen den t-Test anzuwenden. Um ganz sicher zu gehen, wurde außerdem noch der Wilcoxon-Test, ein nicht parametrischer Test, der selbst dann zulässig wäre, wenn es sich bei den Ergebnissen um nicht statistisch normal verteilte Werte handeln würde, angewandt. Beide Teste stimmten in allen Fällen überein.

Die Mittelwerte $\bar{x}$ der absoluten und relativen LFMK-Bestimmungen, der Berechnung des Fibrinogen-Gehalts und der Thrombozytenzählung sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Ebenso sind dort die mittels t-Test errechneten Signifikanzen (p), die sich beim statistischen Vergleich der einzelnen Mittelwerte errechnen, angegeben. Verglichen wurden die Mittelwerte der Parameter beim septischen Abort mit denen aller anderen Gruppen. Die Gruppe a (normale Schwangerschaften) und b (nicht infizierte Aborte) wurden dabei zusammengefaßt, da ihre Mittelwerte weitgehend übereinstimmen.

	a	b	c	d	e	t-Test I:d gegen a oder b II:d gegen c III:d gegen e
	Normale Schwanger- schaft 6-20 SSW	Nicht infiz. Aborte	Infiz. Aborte	Sept. Aborte	Sept. Aborte mit Heparin	
N = Anzahl der Pat.	21	13	10	14	7	
LFMK% des Gesamt- Fibrinogen	2.9 (± 0.6)	2.9 (± 0.5)	4.3 (± 1.2)	5.5 (± 1.4)	4.1 (± 0.9)	I : $p < 0.001$ II : $p < 0.05$ III: $p < 0.02$
LFMKmg/100ml	8.8 (± 3.0)	8.3 (± 3.2)	14.2 (± 6.8)	21.5 (± 8.6)	14.6 (± 3.2)	I : $p < 0.001$ II : $p < 0.005$ III: $p < 0.05$
Thrombozyten $\times 10^3/\text{mm}^3$	201 (± 37)	210 (± 64)	221 (± 47)	99 (± 36)	143 (± 60)	I : $p < 0.001$ II : $p < 0.001$ III: $p < 0.05$
Fibrinogen- mg/100 ml	296 (± 77)	290 (± 137)	342 (± 104)	369 (± 84)	354 (± 40)	I : $p < 0.01$ II : N.S. III: N.S.

N.S. = nicht signifikant

Zahlenangaben in Klammern bezeichnen die Standardabweichungen.

Der Vergleich ergab in allen Fällen statistisch signifikante Unterschiede, nur mit zwei Ausnahmen: Der Fibrinogengehalt von septischen Aborten ist nicht signifikant unterschiedlich von denjenigen bei Heparin-behandelten septischen Aborten und infizierten Aborten.

Die Abb. 3 gibt eine graphische Übersicht über die Mittelwerte der einzelnen Parameter. Hier sind die Mittelwerte von Thrombozytenzahl, Fibrinogengehalt, relativen LFMK%, absolutem LFMK-Gehalt der einzelnen Gruppen gegenübergestellt. So läßt sich besonders gut erkennen, wie z.B. die Thrombozyten beim septischen Abort abfallen während die beiden LFMK-Werte ansteigen. In die Graphik sind außerdem noch die Standardabweichungen vom Mittelwert eingetragen.

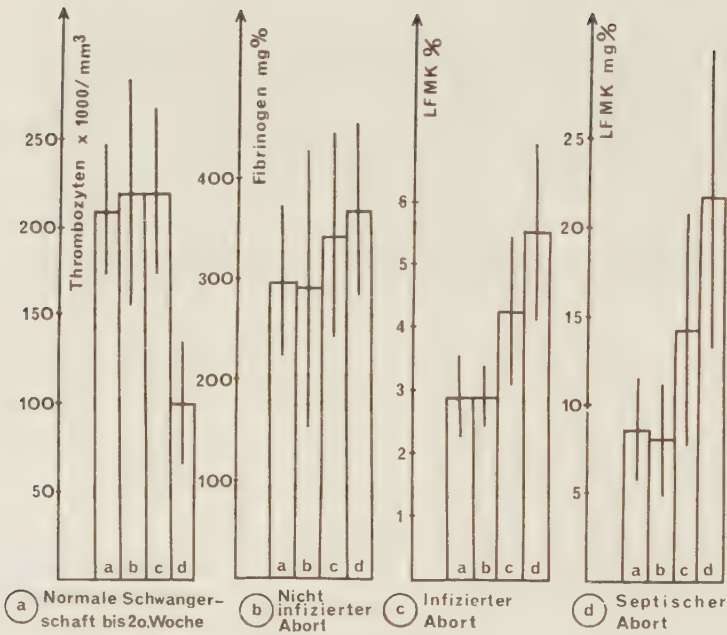


Abb. 3

Übersicht über Thrombozytenzahl, Fibrinogengehalt, relativem LFMK% und absoluten LFMK-Gehalt bei : a) normalen Schwangerschaften bis 20. SSW, b) nicht infiz. Aborte, c) infiz. Aborte, d) septische Aborte.

Die Gruppe der 7 Patientinnen mit Heparin anbehandelt sept. Aborten sind der besseren Übersicht halber nicht in diese Graphik mit eingezeichnet.

Im einzelnen sind folgende Ergebnisse besonders erwähnenswert:

LFMK-Werte:

Sowohl der relative, wie auch der absolute LFMK-Gehalt ist bei der Gruppe der Patientinnen mit septischem Abort erhöht. Der Mittelwert beträgt 5,5 % (relativ) bzw. 21,5 mg% (absolut). Der höchste Einzelwert betrug 7,5 %. Er wurde bei einer Patientin gefunden, die mit Fieber von 39,5° C eingeliefert wurde. Der Godal-Test war bei dieser Patientin positiv (s.o.), die Thormozytenzahl auf 108.000 erniedrigt.

Vergleicht man die LFMK-Mittelwerte septischer Aborte mit denen aus den anderen Gruppen, so zeigt sich, daß dieser gegenüber denen aus den Gruppen a (normale Schwangerschaften) und b (nicht infizierte Aborte) mit einer Signifikanz von $p < 0.001$ differiert. Sogar gegenüber Gruppe c (infizierte Aborte) ergibt sich eine Signifikanz von $p < 0.05$, und das obwohl die Gruppe c gegenüber a und b bereits deutlich erhöhte LFMK-Werte aufweisen. Die LFMK-Werte betreffend ergibt sich also folgende Abstufung, die auch aus der Abb. 3 auf einen Blick erkenntlich ist: $LFMK_a = LFMK_b$, $LFMK_b \ll LFMK_c$, $LFMK_c \ll LFMK_d$. Das Gesagte gilt sowohl für die relativen LFMK%-Werte, als auch für die absoluten LFMKmg%-Werte, was durchaus verständlich ist, wenn man bedenkt, daß sich der eine Wert aus dem anderen berechnet, wobei lediglich der Fibrinogengehalt mit eingeht (s.o.).

Eine Sonderstellung nehmen die 1-2 Tage mit Heparin anbehandelten septischen Aborte ein. Man kann wohl annehmen, daß ihre LFMK-Werte vor der Heparin-Therapie ebenso hoch waren, wie die der Patientinnen aus der Gruppe mit unbehandelten septischen Aborten. Die gefundenen LFMK-Mittelwerte liegen nun nach Heparin-Behandlung bei 4,1 % (relativ) bzw. 14,6 mg% (absolut) und fallen somit in unmittelbare Nähe der entsprechenden Werte aus Gruppe c (infizierte Aborte).

Es unterscheiden sich also die LFMK-Werte der unbehandelten septischen Aborte von denen der Heparin-behandelten septischen Aborte signifikant ($p < 0,02$, relativ; $p < 0,05$ absolut). Im Zusammenhang mit den später zu besprechenden Verlaufskontrollen erscheint diese Tatsache von besonderer Bedeutung.

Abb. 4 zeigt die Verteilung der absoluten LFMK-Werte des gesamten, in dieser Arbeit eingegangenen Materials. Wie man sieht ist sie einer Normalverteilung ähnlich. Sie unterscheidet sich jedoch von einer solchen dadurch, daß sie rechts flacher ausläuft und bei 7,5 noch einen Gipfel hat. Die Rechtsverschiebung wird durch die 14 Fälle mit septischem Abort hervorgerufen, deren LFMK deutlich höher liegt und die sich deswegen aus dem sonst annähernd homogenen Untersuchungsmaterial abheben. Weiterhin ist aus der Abbildung zu sehen, daß der Hauptgipfel bei 3,0 liegt, was in etwa einem Wert zwischen den Gruppen a und b und dem Rest entspricht.

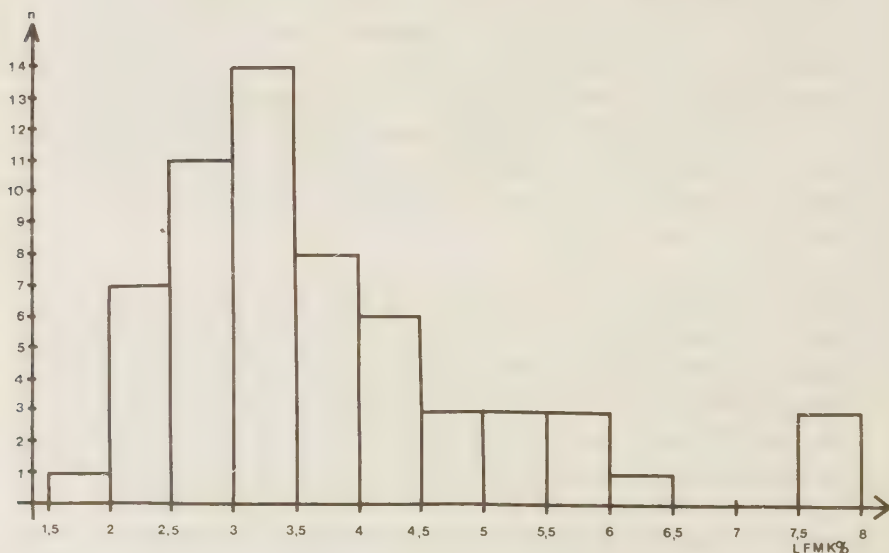


Abb. 4.

Verteilung der LFMK-Werte aus dem gesamten Untersuchungsgut.

Der Fibrinogengehalt.

Wie aus der Abb. 3 ersichtlich, ergibt sich bei den Fibrinogenmittelwerten folgende Abstufung:

$$\begin{aligned} \text{Fibrinogen}_a &= \text{Fibrinogen}_b, & \text{Fibrinogen}_b &< \text{Fibrinogen}_c, \\ \text{Fibrinogen}_c &< \text{Fibrinogen}_d. \end{aligned}$$

Sie geht somit in etwa parallel zu der Abstufung, die wir bei den LFMK-Werten gefunden haben. Der Unterschied liegt darin, daß die Sprünge nicht so groß sind. Dementsprechend ist der Fibrinogengehalt bei septischen Aborten zwar höher als bei infizierten Aborten und behandelten septischen Aborten, jedoch statistisch nicht signifikant unterschieden. Einzig gegenüber den normalen Schwangerschaften und den nicht infizierten Aborten findet sich eine Signifikanz von $p < 0,01$. Diese vergleichsweise schlechte Ausbeute an Signifikanz ist wohl z.T. auch dadurch bedingt, daß der Fibrinogengehalt schon physiologischerweise einer gewissen Schwankungsbreite unterworfen ist, was sich auch in der hohen Standardabweichung der Mittelwerte niederschlägt. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß bei allen hier untersuchten Patientengruppen infolge Schwangerschaft bzw. Abortus der Fibrinogengehalt mehr oder weniger erhöht ist - ein Norm-Fibrinogengehalt von ca. 200 mg/100 ml Plasma zugrunde gelegt.

Thrombozytenzahl:

Die Thrombozytenzahl ist bei Patientinnen mit septischem Abort erheblich erniedrigt. Der Mittelwert liegt bei 99.000. Bei einer unteren physiologischen Grenze von 150.000 ist dieser Mittelwert ein deutliches Zeichen für die Schwere des Krankheitsbildes dieser Patientinnen. Im statistischen Vergleich unterscheiden sich die Thrombozytenzahlen der septischen Aborte von allen anderen Gruppen mit der höchstmöglichen Signifikanz. Lediglich die behandelten septischen Aborte weisen einen ebenfalls erniedrigten Thrombozytenmittelwert von 143.000 auf, unterscheiden sich aber

dennoch signifikant ($p < 0,05$) von den unbehandelten Fällen. Die Abb. 2 zeigt, daß die Mittelwerte der Thrombozytenzahl der einzelnen Gruppen keine Abstufung vergleichbar der LFMK- und Fibrinogen-Werte aufweisen. Im Gegenteil zeigt sich hier, daß die Thrombozytenmittelwerte konstant um den Wert 210.000 liegen. Das gilt für die Gruppe der normalen Schwangerschaften, die der nicht infizierten Aborte und, was besonders bemerkenswert ist, auch für die Gruppe der Patientinnen mit infizierten Aborten. Ausschließlich die beiden Kollektive der septischen Aborte zeigen eine Erniedrigung der Mittelwerte, wobei diese bei den unbehandelten septischen Aborten so drastisch ist, daß der Mittelwert auf weniger als die Hälfte absinkt.

Die niedrigste Einzelthrombozytenzahl von 40.000 wurde bei einer Patientin gefunden, die mit septischem Abort eingewiesen wurde. Sie hatte hohes Fieber ($40,5^{\circ}\text{C}$), Schüttelfrost und bot insgesamt ein lebensbedrohliches Krankheitsbild. Der Äthanol-Test war zweifach positiv, Fibrinogen auf 352,5 erhöht, die LFMK-Werte auf 5,0 % (relativ) bzw. 17,63 mg% (absolut) angestiegen.

Verlaufskontrollen:

Bei 3 Patientinnen wurden Serienbestimmungen der verschiedenen Parameter vorgenommen. Abb. 5 gibt den Verlauf der relativen LFMK-Werte wieder. In allen beobachteten Fällen wird ein deutliches Absinken der Werte pro Zeiteinheit im Verlauf der Heparin-Therapie beobachtet. Ebenso wie die relativen LFMK-Werte sinken natürlich auch die absoluten LFMK-Werte. Die Zahl der Thrombozyten verhält sich umgekehrt. Hier liegt der Tiefpunkt vor Beginn der Therapie. Im Zuge der allgemeinen Besserung während der nächsten Tage erholten sich auch die Thrombozytenwerte und stiegen allmählich wieder zur Norm an. Hierfür ein konkretes Beispiel: Patientin mit septischem Abort bei der Einlieferung Thrombozyten 95.000; $39,2^{\circ}\text{C}$ Fieber; LFMK% 5,53.

Nach 20-stündiger Heparin-Therapie:

Thrombozyten 101.000; Temperatur 37,5°C; LFMK 4,11 %.

Nach 68-stündiger Heparin-Therapie:

Thrombozyten 251.000; Patientin entfiebert; LFMK% 3,35.

Während dieser Beobachtungszeit sinkt der Fibrinogengehalt nur wenig von seinem Maximalwert zu Beginn der Behandlung.

In diesem Zusammenhang kann man die Gegenüberstellung von Gruppe d und e (unbehandelte septische Aborte und Heparin-behandelte septische Aborte) als eine Art gepolte Verlaufskontrolle auffassen. Es bestätigen sich die oben anhand von Einzelbeobachtungen erzielten Ergebnisse:

Die beiden LFMK-Mittelwerte der behandelten Gruppe sind signifikant niedriger, die Thrombozytenzahl signifikant höher als die der unbehandelten Gruppe. Der Fibrinogengehalt verändert sich nur unwesentlich, so daß sich kein statistisch signifikanter Unterschied ergibt.

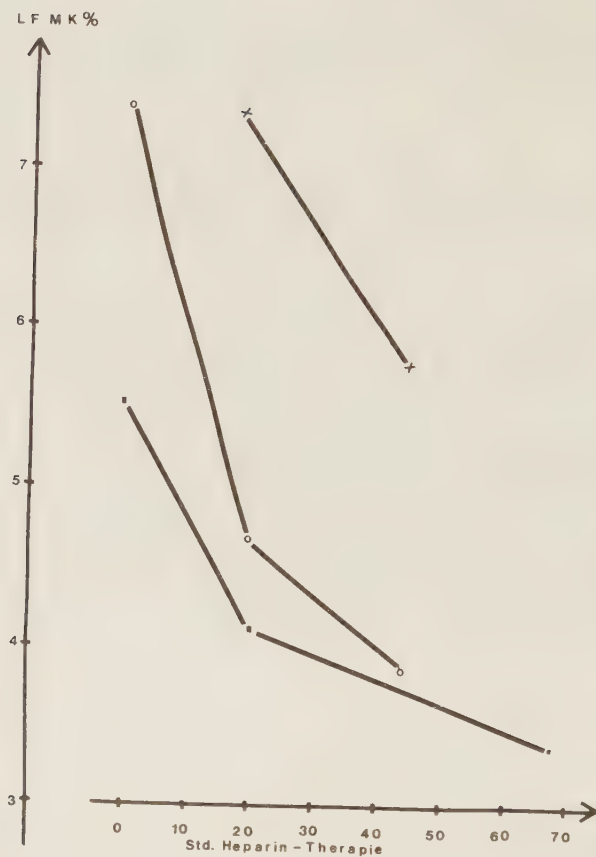


Abb. 5.

Zeitlicher Verlauf der LFMK-Werte unter Heparin-Therapie.
(30.000 I.E. / 24^h).

Äthanol-Test:

Die strenge Auslegung nach Godal und Abildgaard fordert für einen positiven Test die Ausbildung eines Gels. Dies konnte in keinem Fall beobachtet werden. Jedoch wurde häufig entweder Spinnwebgerinnelsbildung oder die Ausbildung eines Fadens im Plasma beobachtet. Die meisten positiven Befunde weist die Gruppe der unbehandelten septischen Aborte auf. Hier fanden sich nur zwei Fälle mit negativen Ergebnissen und insgesamt doppelt so viele positive wie in der Gruppe a (normale Schwangerschaften) oder b (nicht infizierte Aborte). Die Abstufung der Gruppen e > d > c b und a läuft völlig paralell mit der der LFMK-Werte. (Größer bedeutet hier mehr positive Testergebnisse).

Der Äthanol-Test nach Godal ist zwar ein äußerst empfindlicher Indikator für Fibrinmonomere, erlaubt jedoch in dieser Form keine quantitative Aussage. Aus diesem Grund wird er im Rahmen dieser Arbeit zwar durchgeführt, zu quantitativen Beurteilungen jedoch nur am Rande herangezogen und auf die aussagekräftigeren LFMK-Werte verwiesen.

Gel-Elektrophorese.

In einigen Fällen von septischen Aborten wurden Gel-Elektrophoresen bestimmter Fraktionen der Gel-Filtration angefertigt. Die Gel-Elektrophorese fand in Gegenwart von SDS und Harnstoff statt. Ein repräsentatives Muster ist in Abb. 6 wiedergegeben. a stellt die Gel.-Elektrophorese einer Fraktion aus der, dem Fibrinogenpeak vorausgehenden, Vorschulter dar. b wurde aus dem aufsteigenden Schenkel des Fibrinogenpeaks entnommen und c stammt aus dem Fibrinogenpeak selber. In der Abbildung erkennt man, daß die Fraktion der Vorschulter die breiteste, die aus dem Fibrinogenpeak die schmalste Proteinbande aufweist, während die Fraktion aus dem aufsteigenden Schenkel in etwa dazwischen liegt.

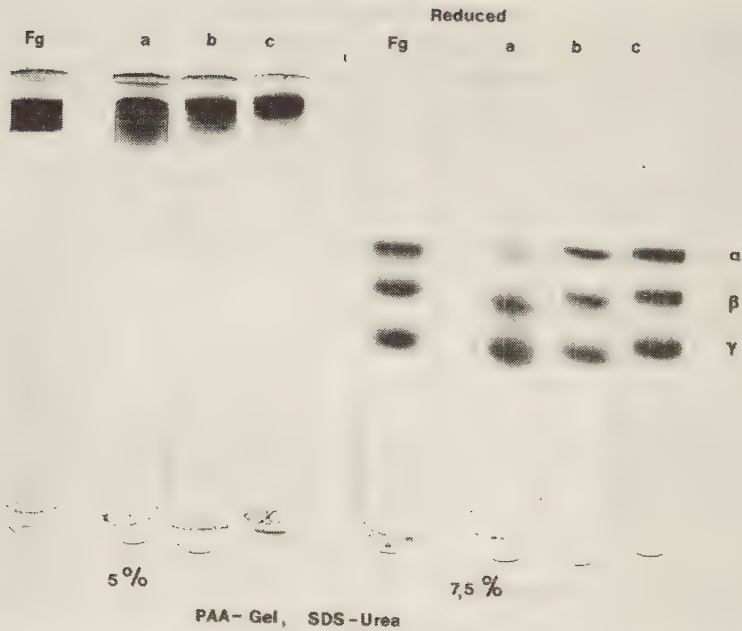


Abb. 6:

Gel-Elektrophorese von Fibrinogen und Fraktionen der Agarose-Gel-Filtration. SDS-Gel-Elektrophorese von nicht reduzierten Proben - links; und von reduzierten Proben - rechts.

Aufspalten in Polypeptidketten.

Durch Reduktion mit Merkaptoäthanol wurden die Moleküle in die einzelnen Peptidketten aufgespaltet. Hier zeigt sich, daß in den a-Fraktionen (Vorschulter) am wenigsten, in den c-Fraktionen (Fibrinogenpeak) am meisten alpha-Ketten nachzuweisen sind. Die b-Fraktionen liegen wieder in der Mitte. Proteinbanden mit langsamerer Wanderungsgeschwindigkeit die gamma-Ketten repräsentieren würden, konnten nicht beobachtet werden.

F. DISKUSSION.

Die aufgezeigten Ergebnisse lassen erkennen, daß bei Vorliegen eines septischen Abortes lösliche Fibrin-monomerkomplexe stark vermehrt auftreten (Mittelwert 5,5 %). Geht man davon aus, daß das Plasma Gesunder einen LFMK-Spiegel von ca. 2,5 % aufweist (36), so ergibt sich für septische Aborte eine LFMK-Erhöhung von über 100 %. Der erhöhte LFMK-Spiegel beweist eine gewisse Hyperkoagulabilität bei diesem Krankheitsgeschehen.

Bei den LFMK handelt es sich, Untersuchungen von Graeff und Mitarbeitern zufolge, (33) in der Hauptsache um Fibrinogen-Fibrin-Monomerkomplexe. Sie besitzen eine dimerische Struktur. Ihr Molekulargewicht ist etwa doppelt so groß wie das des Fibrinogens selbst. In vitro können solche Komplexe erzeugt werden, in dem kleine Mengen Thrombin zu Plasma hinzugefügt werden (37,19). Die in vivo entstandenen Komplexe scheinen ebenfalls durch Thrombineinwirkung oder zumindest durch das Einwirken eines thrombinähnlichen Enzyms zu entstehen.

Alle anderen untersuchten Kollektive lassen ebenfalls LFMK-Erhöhung erkennen. Bei den beiden Gruppen a und b (normale Schwangerschaften und nicht infizierte Aborte) steigen die LFMK-Werte nur auf einen Mittelwert von 2,9 % an. Das ist wohl nicht als Folge eines krankhaften Geschehens zu betrachten, sondern eher im Rahmen der kontinuierlichen LFMK-Erhöhung im Verlauf der Schwangerschaft zu sehen (10). Schon früher wurde im Blut von Schwangeren ein Fibrinogenderivat mit größerem Molekulargewicht als Fibrinogen nachgewiesen (38,33).

Bedeutend größer dagegen ist der LFMK-Anstieg bei den infizierten Aborten ($\bar{x} = 4,3 \%$). Während bei den septischen

Aborten ein vergleichbarer LFMK-Anstieg von einem erheblichen Thrombozytenabfall begleitet ist (16,31), bleibt hier die Thrombozytenzahl noch unverändert. Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß zumindest bei Patientinnen mit infiziertem Abort das Endotoxin höhere LFMK-Werte induziert, noch ehe die Thrombozytenzahl zu sinken beginnt. Dieses ist um so bemerkenswerter, als Beller und Graeff mit experimentellen Daten über Endotoxin-Infusionen zeigen konnten, daß der Thrombozytenabfall schon beginnt, noch ehe die intravasculäre Gerinnung begonnen hat und sogar noch ehe das plasmatische Gerinnungssystem überhaupt beteiligt ist (40,41).

Die löslichen Fibrinmonomerkomplexe wären somit ein äußerst frühreagierender und empfindlicher Indikator zur Erkennung der Hyperkoagulabilität - also diejenige Methode, die erste Hinweise auf ein solches Geschehen zu geben vermag, während alle anderen quantitativen Untersuchungen noch versagen.

Der erhöhte LFMK-Gehalt der Gruppe der septischen Aborte ist Ausdruck eines erhöhten Abbaus von Fibrinogen. Das Gleichgewicht: Fibrinogen $\xrightarrow{\text{Thrombin}}$ Fibrinmonomer $\xrightarrow{\quad}$ Fibrinaggregate verschiebt sich nach rechts. Auslösender Faktor dabei ist ein gesteigerter Umsatz an Gerinnungsfaktoren (4,43). Der zugrunde liegende Mechanismus ist eine bislang ungeklärte Thrombinaktivierung. Thrombin bildet aus dem Fibrinmolekül Fibrinmonomere, welche als Komplexe das LFMK darstellen (20). Die Endstufe dieses Vorgangs ist die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC), bei der Gerinnsel in der terminalen Strombahn nachweisbar sind. Die so entstandenen Gefäßverschlüsse - bevorzugt sind Lunge, Niere, ZNS, Hypophyse - sind prinzipiell reversibel. Besteht allerdings die resultierende Mikrozirkulationsstörung über längere Zeit, so muß mit bleibenden Organschäden gerechnet werden (20). Die aufgrund dieses Mechanismus entstandene disseminierte intravasale

Gerinnung stellt einen wesentlichen pathogenetischen Faktor des Endotoxinschocks in der Schwangerschaft dar (44,3,12,5,15).

Als Folge der Gefäßverschlüsse kann sich ein mehr oder minder kompletter Zusammenbruch des Systems der Hämostase entwickeln. Es ist auch möglich, daß durch die beschriebenen Gerinnsel eine wahrscheinlich mechanisch bedingte Hämolyse auftritt (46,48,49, 15,47).

Ein weiterer Beleg für den gesteigerten Fibrinogenstoffwechsel ist in dem erhöhten Fibrinogenplasmaspiegel zu sehen. Er ist bei den septischen Aborten am höchsten (369 mg%) und bei den infizierten und unbehandelten septischen Aborten erhöht gegenüber der Gruppe a und b (normale Schwangerschaften und nicht infizierte Aborte). Somit geht er parallel zu der LFMK-Vermehrung der entsprechenden Gruppen.

Das Fortschreiten der Endotoxinämie mit seinen klinischen Zeichen wie Fieber über 39° C und Schüttelfrost geht Hand in Hand nicht nur mit einer beträchtlichen LFMK-Erhöhung, sondern auch mit z.T. exzessiver Thrombozytenverminderung (Thrombozytenmittelwert bei septischen Aborten 99.000/mm³). Die Thrombozytopenie, die sich ausschließlich bei den septischen Aborten findet, ist wohl darauf zurückzuführen, daß es unter dem Einfluß der bakteriellen Endotoxine zur Aggregation der Thrombozyten in der Gefäßperipherie, kommt. Sie geht über das Ausmaß der häufigen postinfektiösen Thrombozytopenie hinaus und ist als erworbene Thrombozytopenie auf dem Boden der Sepsis aufzufassen. (42). Dazu paßt gut, daß es, wenn das Krankheitsgeschehen fortschreitet und es zu Schocksymptomen kommt, klinisch auch die petechialen Hautblutungen nicht fehlen. Die Prognose der Thrombozytopenie ist gut. Bei der beschriebenen Therapie kommt es nach einigen Tagen zu einem Anstieg der Werte, so daß selbst in ausgeprägten Fällen die Transfusion von Thrombozytenextrakten nicht erforderlich ist.

Einen interessanten Aspekt bieten die Serienbestimmungen zusammen mit der Gruppe der Heparin-anbehandelten septischen Aborte dieser Arbeit:

Der Mittelwert der Thrombozytenzahl von Heparin-anbehandelten Patientinnen von 143.000, ein Wert also, der zwischen dem pathologisch niedrigen der Gruppe d und dem noch normalen der Gruppe c liegt, ist wohl so zu verstehen, als haben sich die Thrombozyten von ihrem Tiefpunkt vor der Therapie (99.000) langsam wieder regeneriert. Zwar ist die Thrombozytopenie normalerweise erst nach 6-8 Tagen vollständig beseitigt, jedoch beginnt der Thrombozytenanstieg schon am 2. Tag nach Beginn des Gerinnungsprozesses (15). Dies läßt sich auch gut an den Serienbestimmungen verfolgen, bei denen im gleichen Maße, wie die LFMK sinken, die Thrombozyten in Richtung Norm steigen.

Die Beobachtung, daß der pathologische hohe LFMK-Spiegel unter Heparin-Therapie wieder abfällt, wie die Serienbestimmungen dieser Arbeit zeigen, zusammen mit der Tatsache, daß der LFMK-Gehalt der Heparin-anbehandelten septischen Aborte signifikant niedriger liegt als der der unbehandelten Gruppe, weist darauf hin, daß der gesteigerte Fibrinogenstoffwechsel sich durch Heparin-Gabe wieder normalisieren läßt. Dadurch wird der Erfolg der Heparin-Therapie bei septischen Aborten, der klinisch schon lange beobachtet wurde, eindrucksvoll belegt und quantitativ messbar.

Zusätzlich deutet der zeitliche Verlauf des LFMK-Abfalls in den Serienbestimmungen darauf hin, daß LFMK in Zusammenhang zu bringen sein könnte mit dem Cryofibrin, wie es von Sherman 1972 beobachtet wurde. Entsprechend liegt die Halbwertszeit für LFMK ebenfalls bei etwa 10-15 Stunden (50).

Graeff und Mitarbeiter konnten zeigen, daß bei der Gel-Filtration LFMK in einer Vorschulter zwischen dem Ausschlußvolumen und dem aufsteigenden Schenkel des Fibrinogen-peaks eluiert wird. Der Nachweis wurde sowohl mit dem

Staphylokokkenclumpingtest als auch mit der Polyacrylamid-Elektrophorese geführt. Außerdem wurde bewiesen, daß diese Vorschulter hauptsächlich aus einer Komponente mit dimerischer Struktur besteht. Sie muß als Fibrinogen-Fibrinmonomerkomplex aufgefaßt werden (7,9). Hier könnte ein Zusammenhang zu dem Cryofibrin bestehen, wie es von Shainoff und Page charakterisiert wurde (51,52).

Eluierte Fraktionen einiger Fälle mit septischem Abort wurde der Elektrophorese mit SDS und Harnstoff nach Reduktion mit Merkaptoäthanol unterzogen. Die Ergebnisse deuten an, daß die löslichen Fibrinmonomerkomplexe in vollständig dissoziierter Form vorliegen und daß Komponenten mit leicht reduzierten alpha-Ketten mit im Spiel sind. Daraus folgert zum einen, daß bei hyperkoagulablen Zuständen auch die Plasmainaktivität erhöht ist (10), zum anderen, es die Komponenten mit leicht reduzierten alpha-Ketten, die als Frühbauprodukte des Fibrinogens anzusehen sind, ebenfalls an der Komplexbildung der LFMK teilhaben (53,54).

Nach den Beobachtungen von Shainoff liegt Cryofibrin möglicherweise ebenfalls in Komplexen vor, leicht plasminisiertes Fibrinogen mit inbegriffen. Letzteres konnte in Verbindung mit dem, von Mosesson und Sherry beschriebenen I-8 oder I-9- Fraktionen gebracht werden (56). Das zeigt, daß offensichtlich beide Wege des Fibrinogenstoffwechsels beteiligt sind.

Das Fehlen bzw. die Anwesenheit kovalent gebundener Fibrinogenderivate in Plasmaproben könnte als Anhaltspunkt für die Differentialdiagnose zwischen Hyperkoagulabilität und intravasaler Gerinnung angesehen werden. Kovalent gebundene Derivate, die durch γ - γ -Dimere charakterisiert sind, wurden bis heute nur bei intravasaler Gerinnung beobachtet (56). In der hier vorliegenden Arbeit wurden in keinem Fall kovalent gebundene Fibrinogenderivate gefunden. Das stützt die Hypothese, daß die Unterscheidung zwischen Hyperkoagulopathie und intravasaler

Gerinnung durch quantitative Gel-Filtration und Ketten-Charakterisierung getroffen werden kann. Außerdem ist nach Graeff sowohl die Menge als auch das Verteilungsmuster der LFMK bei Hyperkoagulopathie und fortgeschrittener disseminierter intravasaler Gerinnung unterschiedlich (7,57,58).

Wie bereits eingangs erwähnt, hat die prophylaktische Verabreichung von Heparin bei Patientinnen mit septischem Abort, wie sie in den letzten Jahren in der I. Frauenklinik der Universität München durchgeführt wurde, überaus gute Erfolge. Die Indikation dazu wurde rein klinisch aufgrund von Schocksymptomen und der Mortalität gestellt (17). Heparin wurde gewählt, weil es allen anderen Koagulantien gegenüber erhebliche Vorteile hat:

Es hat einen kurzen Eintrittseffekt und ist gut steuerbar. Thrombin- und Gerinnungszeit werden verzwei- bis -dreifacht. Sein therapeutischer Effekt besteht nicht in der Verhinderung der Thrombozytenagglutination (16), sondern in der Verhinderung eines Fibrinausfalls. Die Patientinnen mit septischen Abort, die im Laufe der vorliegenden Arbeit untersucht wurden hatten keine klinischen Zeichen eines Endotoxinschocks oder der intravasalen Gerinnung. Erst die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Bestimmungen, vor allem LFMK- und Fibrinogenspiegel, bewiesen eine z.T. ausgeprägte Hyperkoagulabilität. Eine weit geringere Hyperkoagulabilität konnte bei Patientinnen mit infiziertem Abort gefunden werden. Außerdem zeigte sich, daß unter Heparin-Therapie die Parameter der Hyperkoagulabilität bei Patientinnen mit septischem Abort sich rasch zur Norm zurückbewegten. Solchen Patientinnen kann also eindeutig durch die prophylaktische Heparin-Gabe geholfen werden. Dieser Schluß, der schon Jahre zuvor anhand von klinischen Überlegungen gezogen worden war, kann also jetzt mit experimentellen Daten gestützt und bestätigt werden.

Mit der Methode der Gel-Filtration, mit der man Auftrennung der LFMK vom Fibrinogen erreicht, kann man erstmals quantitative Aussagen über den LFMK-Gehalt machen. Ein Rückschluß auf den Grad der vorliegenden Hyperkoagulabilität ist damit möglich.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die gute Reproduzierbarkeit. Andere Methoden wie Cryopräzipitation (59), Fällung mit Protaminsulfat (60) und der, auch in dieser Arbeit verwendete Äthanol-Test können keine vergleichbaren Ergebnisse aufweisen.

Das ist auch der Grund dafür, daß bis heute über die absolute Genauigkeit der Gel-Filtration wenig ausgesagt werden kann. Ein quantitativer Vergleich zweier Methoden war bisher nicht möglich.

Es soll allerdings nicht verschwiegen werden, daß die Gel-Filtration bzw. deren Auswertung unvermeidliche Fehlerquellen aufweist. So ist es nicht möglich, die LFMK der Vorschulter und das Fibrinogen des Hauptpeaks eindeutig zu trennen. Sowohl bei der in vivo als auch bei in vitro-Untersuchungen wurde bewiesen, daß auch Fraktionen, die aus dem aufsteigenden Teil des Fibrinogenpeaks stammen, geringe Mengen von LFMK enthalten (61,9,33). Der willkürlich gezogene Trennstrich zwischen LFMK (A) und Fibrinogen (B) - Bereich (Abb.2) muß also einen gewissen Fehler verursachen. Dieser wird allerdings zumindest teilweise dadurch wieder kompensiert, daß auch im Bereich (A) noch Spuren von freiem Fibrinogen nachweisbar sind. Diese unvermeidliche Fehlerquelle bewirkt, daß bei geringen LFMK-Anteilen, z.B. bei gesunden Patientinnen, der gefundene Wert sicherlich zu hoch liegt (61), während bei höheren LFMK-Werten, wie sie in dieser Arbeit meist vorlagen, der Fehler sich weniger bemerkbar macht.

Trotz dieser Nachteile ist die Gel-Filtration die beste Methode um LFMK nachzuweisen und das Ausmaß einer Hyperkoagulabilität zu belegen. Thrombembolische Erkrankungen können so früh erkannt werden und eine wirksame Therapie kann eingeleitet werden. In Verbindung mit der quantitativen Analyse der löslichen Fibrinmonomerkomplexe (18, 56) zeigt die Methode einen Weg das Ausmaß und die Pathogenese einer Verbrauchs-Koagulopathie zu beschreiben.

G. ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die guten Erfolge der Heparin-Prophylaxe, die sich vorwiegend auf klinische Beobachtungen stützten, sollen durch diese Arbeit experimentell belegt werden.
2. Es wurde das Blut von Patientinnen mit septischem Abort, infiziertem Abort, nicht infiziertem Abort und normalen Schwangerschaften bis zur 20. Woche untersucht.
3. Als Parameter der Hyperkoagulabilität interessierten vor allem die LFMK-Werte. Zu ihrer Bestimmung dienten folgende Methoden:
Äthanol-Test und Gel-Filtration, β -alaningefällter Plasma-proben.
4. Bei Patientinnen mit septischem Abort wurden stark erhöhte LFMK-Werte gefunden. Mittelwerte mit Standardabweichungen: 5,5 % $\pm$ 1,4 (relativ) 21,5 mg/100 ml Plasma $\pm$ 8,6 (absolut).
5. Im statistischen Vergleich ergab sich gegenüber den normalen Schwangerschaften und den nicht infizierten Aborten eine Erhöhung auf dem statistisch höchstmöglichen Niveau ($p < 0.001$).
6. Die Plättchenzahl war nur bei den septischen Aborten erniedrigt; bei den Gruppen der normalen Schwangerschaften, nicht infizierten Aborten, infizierten Aborten war sie normal.
7. Trotz normaler Plättchenzahl (221.000 $\pm$ 47.000) wies die Gruppe der infizierten Aborte bereits signifikant erhöhte LFMK-Spiegel auf (4,3 $\pm$ 1,2 % bzw. 14,2 $\pm$ 6,8 mg/100 ml).

8. Die Patientinnen mit septischem Abort wurden mit Heparin behandelt (30.000 IE/die). Das bewirkte sowohl im Kollektiv (septische Aborte unbehandelt / septische Aborte behandelt) als auch bei den verfolgten Einzelfällen eine Normalisierung der LFMK-Werte.
9. Kettenanalyse der LFMK ergab häufig einen verminderten Anteil an alpha-Ketten.
10. gamma-gamma-Dimere als Ausdruck intermolekularer Quervernetzungen wurden nicht beobachtet.
11. Die erhobenen Befunde belegen die Annahme, daß bei Patientinnen mit septischem Abort eine ausgeprägte Hyperkoagulabilität vorliegt.

Anhang

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s .

- 1) Beller, FK.: Die Gerinnungsverhältnisse bei Schwangeren und beim Neugeborenen. Barth, Leipzig (1957)
- 2) Schneider, Ch.: Fibrin embolism (disseminated intravascular coagulation) with defibrination as one of the endresults during abrupte placentae. Surg. Gynec. Obstet. 92, 27 (1961)
- 3) Mac Kay, D.G.: Disseminated intravascular coagulation, an intermediary mechanism of disease. Haper u. Row, New York (1965)
- 4) Läscher, H.G.: Verbrauchskoagulopathie (Pathogenese und Therapie) Folia Haemat. (Frankfurt) N.F.1, 325 (1961)
- 5) Selye, H.: Thrombohaemorrhagic Phenomena. Thomas, Springfield (1966).
- 6) Fletcher, A.P., Alkjaersig, N., and O'Brien, J.: Blood hyperkoagulability and thrombosis. Abstract Vol. XIII. International Congress of Haematology Munich 28. August, 244, 1970
- 7) Graeff, H. and von Hugo, R.: Identification of fibrinogen derivatives in plasma samples. Thrombos. Diathes. haemorrh. 27, 610 (1972)
- 8) Vermeylen, J., Donati, M.B. and Verstraete, M.: The identification of fibrinogen derivatives in plasma and serum by agarose gel filtration. In: Fibrinogen degradation products. M. Verstraete, J. Vermeylen, M.B. Donati (Eds.) Scand. J. Haematol. Suppl. 13, 219 (1971)
- 9) von Hugo, R., Graeff, H.: Formation of soluble fibrin monomer complexes in human plasma. Thrombosis Research Vol. III pp. 183-190 (1973)
- 10) Hafter, R., Schneeberger, T., Tafel, K., Ernst E., Graeff, H.: Bestimmung von löslichen Fibrinmonomerkomplexen zur Erfassung der Hyperkoagulabilität in der Schwangerschaft und unter der Geburt. Geburtshilfe und Frauenheilkunde 35, 518 - 525, (1975) Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart

- 11) Marx, R.: Über thrombophile und haemorrhagische Diathesen bei Krebs. In: Krebs u. Blutgerinnung. Herausgegeben E. Deutsch, M. Fischer, K. Lechner. S. 101. F.K. Schattauer, Stuttgart (1968)
- 12) Hardaway, R.M.: Syndromes of disseminated intravascular coagulation. Springfield, III. Thomas Ch.C.-Management of shock. Vortrag geg. 11. Chirurg. Univ. Klinik Heidelberg 21.3. (1969)
- 13) Gelin, L.E.: Flüssigkeitersatz im Schock. In: Schock, Pathogenese und Therapie. S. 372, Herausg. K.D. Bock. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag (1962)
- 14) Schneider, M.: Zur Pathophysiologie des Schocks. In: K. Horatz u. R. Frey: Schock u. Plasmaexpander, S. 1. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer Verlag (1969)
- 15) Kuhn, W., Maus H., Graeff, H.: Klinik des Endotoxinschocks bei infiziertem Abort. Gynäkologe Bd. 2, Heft 1 (1969) S. 18-31.
- 16) Kuhn W., Graeff H.: Prophylaktische Maßnahmen beim septischen Abort. In: Zander, J. (ed). Septischer Abort u. bakterieller Schock. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York o. 74 (1968)
- 17) Graeff, H., Kuhn, W., Zander, J.: Endotoxin shock in obstetries. In: Gram-negative bacterial infections by B. Urbaschek, R. Urbaschek and E. Neter. Springer Verlag, Wien - New York pp. 446-449 (1975)
- 18) Graeff, H., von Hugo, R.: Fibrinogen derivatives in a case of abruptio placentae, American Journal of Obstetrics and Gynecology. 120, 335-340 (1974)
- 19) von Hugo, R., Hafter, R., Stemberger, A., Graeff, H.: Soluble fibrin monomer complexes demonstrated by agarose gel filtration and absorption on insolubilized fibrinogen Thromb. et diathesis hämoorh.. 34, 1, (1975)
- 20) Kuhn, W., Reichle, G., Graeff, H.: Der infizierte Abort. In: Tägliche Praxis. 14. S. 445-455, H. Marseille Verlag München (1973)
- 21) Kuhn, W., Graeff, H.: Der "septische Abort". Deutsches Ärzteblatt Heft 31 (1972)

- 22) Strumia, M.M.: Haematocrit Americ.J.Clin.Path. 24:1016 (1954)
- 23) Godal, H.C.,
Abildgaard, U.,
Kierulf, P.: The ethanol-test an indicator of fibrinemia.
Coagulation 4: 343 (1971)
- 24) Godal, H.C.,
Abildgaard, U.: Gelation of soluble fibrin in plasma by ethand.
Scand.J.Haemat. 3: 343 (1966)
- 25) Blombäck, B. und
Blombäck, M.: Purification of human and bovine fibrinogen
Arkiv Kemi, 10, 415 (1956)
- 26) Hörmann u.
Gollwitzer: Analytische Untersuchungen über Rinderfibrinogen u. -fibrin. Z. Physiol.Chem. 346, 21 (1966)
- 27) Biggs, R. und
Mac Farlane, R.G.: Human blood coagulation and it's adisorders.
Backwell, Oxford (1962)
- 28) Straub, W. und
Duckert, W.: The formation of the Extrinsic Prothrombin Activator
Thromb.Diath.Haemorrhag., 5, 402 (1961)
- 29) Seligson, U.,
Rapaport, S.J.,
Knefler, P.R.: Extraadrenal effect of ACTH on fibrinogen syntheses Americ. J. Physiol.224, 1172 (1973)
- 30) Cohn, E.J.,
Strong, L.E.,
Hughes jr., W.L.,
Mulford, D.E.,
Ashworth, J.N.,
Melin, M. und
Taylor, H.L.: J. Am. Chem. Soc., 68, 459, (1946)
- 31) Determann, H.: Gel-Chromatographie, Springer Verlag, Berlin (1967)
- 32) Katalog der Bio-Rad-Laboratories G.m.b.H. S. 44 München (1968)
- 33) Graeff, H.,
von Hugo, R.,
Hafter, R.: In vivo formation of soluble fibrin monomer complexes in human plasma Thrombos. Res. 3 465 (1973)
- 34) Weber, K. and
Osborne, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel elektrophoresis.
J.Bid. Chem. 244, 4406 (1969)
- 35) Geigy Wissenschaftliche Tabellen.
- 36) Hörmann, H.,
Ströder, W.: Investigation on the cold insoluble fraction of fibrinogen. In: Abstract Volume IV.
Int. Congress on Thrombosis and Haemostasis, Vienna June 19.-22. S. 386 (1973)

- 37) Kierulf, P.: Studies on soluble fibrin in plasma. IV: Isolation and characterisation of the clottable protein, obtained from thrombin-incubated plasma upon gelation with etanol. *Thromb. Res.* 3, 613 (1973)
- 38) Alkjaersig, N., Fletcher, A.P., Burstein, R.: *Thromb. Diath. Haemorrh.* 49; 123 (1971)
- 39) Beller, F.K. and Douglas, G.W.: Thrombocytopenia indicating gram-negative infection and endotoxemia. *Obstet. Gynecol.* 41, 521 (1973)
- 40) Beller, F.K. and Graeff, H.: Deposition of glomerular, fibrin in the rabbits infusion with endotoxin. *Nature* 215, 295 (1967)
- 41) Graeff, H., Beller, F.K.: Haematological Studies during Endotoxin Infusion in Rabbits *Thrombos. Diath. Haemorrh.* Vol. XX No 3/4 (1968)
- 42) Vinazzer, H.: *Gerinnungsstörungen in der Praxis*, G. Fischer Verlag, Stuttgart (1972)
- 43) Lasch, H.G., Heene, D.L., Huth, K. und Sandritter, W.: *Americ. J. Cardiol.* 20, 381 (1967)
- 44) Graeff, H., Bach, H.G.: Der Geburtsschock. In: *Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe*. S. 75-120 Herausg. H. Schwalm u. G. Döderlein, München Berlin, Urban Schwarzenberg (1965)
- 45) Zander, J.: *Septischer Abort und bakterieller Schock*. Berlin-Heidelberg-New York- Springer (1968)
- 46) Kreche, H.J.: et al.: *Klinisch-pathologische u. experimentelle Untersuchungen zur bilateralen Nierennekrose in: Aktuelle Probleme der Nephrologie*. (Springer 1966)
- 47) Brain, M.C.: *Brit. Haematol.* 13, 868 (1967)
- 48) Regoeczi, E., Rubenberg, L.M., Brain, M.C.: Intravascular Haemolysis And Dissiminated Intravascular Coagulation. *Lancet*. 601 (1967)
- 49) Graeff, H. u. Beller, F.K.: Plasminogen assays using fibrin as a substrate New York Academic press 1968

- 50) Sherman, L.A.: Fibrinogen turnover: Demonstration of multiple pathways of catabolism. *J. Lab. Clin. Med.*, 79, 710 (1972)
- 51) Shainoff, J.R., Page, J.H.: Significance of eryofibron in fibrinogen-fibrin conversion *J. Exp. Med.* 116, 687 (1962)
- 52) Shainoff, J.R.: et al.: Ultrazentrif. studies on the reaction between thrombin and plasmanised fibrin. *Thrombos. Diath. haemorrh. suppl.* 39, 203 (1970)
- 53) Lipinski, B., Wegrzynowicz, Z. et al.: Soluble unclottable complexes formes in the presence of fibrinogen degradation products (FDP) during the fibrinogen-fibrin conversion and their potential significance in pathology *Thrombos. Diathes. haemorrh.* 17, 60 (1967)
- 54) Lipinski, B., Worowski, F.: Detection of soluble fibrin monomer complexes in blood by means of protamine sulphate test. *Thrombos. Diathes. haemorrh.* 20, 44 (1968)
- 55) Mosesson, A.W., Sherry, S.: The preparation and properties of human fibrinogen of relatively high solubility. *Biochemistry* 5, 2829 (1966)
- 56) Hafter, R., Graeff, H.: Molecular aspects of defibrination in a case of "dead fetus syndrome". In *Vorbereitung Thrombosis Res.* 7, 391 (1975)
- 57) Graeff, H., von Hüge, R., Kuhn, W., Scholz, H., Ernst, A., Gastroph, R.: Fibrinogen derivates with a higher molekular weight than that of the parent molecule in cord vein plasma of newborns. *Klinische Wochenzeitschrift* 51, 695 (1973)
- 58) von Hüge, R., Graeff, H.: Fibrinogen derivates with a higher molekular weight than that of the parent molecule in cord vein plasma of newborns. *Klinische Wochenzeitschrift* 51, 699 (1973)
- 59) Chandra et al: Serum Levels of α_2 -macroglobin and Ig G and cryofibrinogenemia in pregnancy. *Obstet. and Gynec.* 41, 56 (1973)
- 60) Kitzmüller, J.L., et al.: Haematologic assays in pre-eclampsia. *Americ. J. Obstet. Gynec.* 118, 362 (1974)
- 61) Ströder, W., Hörmann, H.: The cold insoluble fibrinogen fraction of bovine and human plasma. *Biochem. biophys. Acta (amst.)* 351, 396 (1974)
- 62) Morison, P.R. *J. Am. Chem. Soc.*, 69, 2723 (1947)

Lebenslauf.

Am 30.1.1948 wurde ich als Sohn von Dr. med. Wolfgang Ernst und seiner Frau Erika, geborene Tillwachs, in Wiesbaden geboren. 1954 Einschulung in die evangelische Volksschule Bad Neuenahr. 1956 Umzug nach Bad Tölz und Besuch der dortigen Volksschule bis 1959. Danach ging ich 2 Jahre auf das staatliche Internat und Gymnasium in Marquartstein. 1961 wechselte ich auf das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium zu Bad Tölz über, wo ich 1969 mein Abitur ablegte.

1969 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München Psychologie zu studieren. 1970 wechselte ich das Studienfach; seither studiere ich Medizin. Ich habe alle Prüfungen in München abgelegt: Naturwissenschaftliche Vorprüfung 1971, ärztliche Vorprüfung 1973, Staatsexamen 1976.

gez. Edzard Ernst

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. H. Graeff, der mir diese Arbeit übertragen hat und immer genug Zeit und Interesse hatte mich dabei geduldig zu betreuen.

Zusätzlich stand mir Dr. Hafter bei Problemen jeder Art im Labor zur Seite, wofür ich ihm aufrichtig danke.

Für die Mithilfe bei praktischen Aufgaben schulde ich Frl. Hoffmann, Frau Maier und Dr. Bocaz Dank.

